DOI:10.16016/j.1000-5404.201606162

胃癌患者外周血 Serpin B1 水平及其基因多态性检测的意义

刘 羽[1],李 勇[1],张志栋[1],檀碧波[1],贾 楠[1],赵雪峰[1],范海燕[2] (050011 石家庄,河北医科大学第四医院:外三科[1],消化内科[2])

[**摘要**] **目的** 检测胃癌患者外周血中丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1(Serpin B1)基因 H67Q 位点多态性的情况及 Serpin B1 蛋白的水平,并对其关系进行探讨。**方法** 选取 2013 年 1 月至 2015 年 12 月在本院就诊并确诊为胃癌的 350 例患者为病例组,同期健康体检者 350 例为对照组。留取外周血,应用 PCR 扩增联合 DNA 直接测序法检测 Serpin B1 基因 H67Q 位点在 2 组中的分布情况,同时检测 Serpin B1 蛋白的水平。将病例组和对照组按基因型再次分组,观察各基因型与 Serpin B1 浓度的关系。Logistic 回归分析探讨 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性与胃癌的关系。**结果** Serpin B1 基因 H67Q 位点存在 T 和 G2 种等位基因,共发现 3 种基因型:野生型纯合子(TT)、杂合突变型(GT)、纯合突变型(GG)。病例组 GG、GT 基因型频率及 G 等位基因均显著高于对照组($P<0.05$)。病例组外周血 Serpin B1 浓度水平明显高于对照组($P<0.05$)。按基因型分组后,病例组和对照组中 GG 基因型者外周血 Serpin B1 浓度水平明显高于 GT、TT 基因型者,GT 基因型者外周血 Serpin B1 浓度高于 TT 基因型($P<0.05$)。Logistic 分析结果显示,GG 基因型及 G 等位基因是胃癌的独立危险因素(*OR* 值为 9.485,95% *CI* 为 2.169~44.283,$P=0.006$;*OR* 值为 5.105,95% *CI* 为 1.847~13.360,$P=0.014$)。**结论** Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性与胃癌有关。

[**关键词**] 胃癌;丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1;基因多态性;外周血
[**中图法分类号**] R394.3;R730.43;R735.2 [**文献标志码**] A

Association of polymorphism of Serpin B1 and its serum protein level in patients with gastric cancer

Liu Yu[1], Li Yong[1], Zhang Zhidong[1], Tan Bibo[1], Jia Nan[1], Zhao Xuefeng[1], Fan Haiyan[2] ([1]Third Department of General Surgery, [2]Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province, 050011, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the relationship between polymorphism of Serpin B1 (serine protease inhibitor, clade B, member 1) gene at H67Q site and Serpin B1 level in the peripheral blood of patients with gastric cancer. **Methods** A total of 350 cases diagnosed with gastric cancer in our hospital from Jan 2013 to Dec 2015 were recruited as case group, and 350 cases of matched healthy people as control group. PCR amplification-combined DNA direct sequencing was applied to test Serpin B1 gene polymorphism at the site of H67Q in both groups using genomic DNA isolated from peripheral blood. The level of Serpin B1 protein in peripheral blood was detected with ELISA and compared among different genotype subgroups. Logistic regression analysis was assessed the relationship between H67Q site polymorphism of Serpin B1 gene and gastric cancer. **Results** Allelic genes T and G were identified at H67Q site of Serpin B1 gene, resulting in 3 genotypes of wild-type homozygous (TT), heterozygous mutant (GT), and homozygous mutant (GG).

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81372580);河北省科技支撑项目(11276103D-26);河北省医学科学研究重点课题计划项目(20160168)
[**通信作者**] 李 勇,电话:(0311)86095678,E-mail:li_yong_hbth@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161021.1700.036.html

The frequencies of GG and GT genotypes, and allelic gene G in case group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). Serpin B1 protein level was higher in case versus control group ($P<0.05$). Among the 3 genotype groups, GG group had the highest level of Serpin B1 followed by GT group, and TT group had the lowest level. The difference between each group comparison was statistically significant ($P<0.05$). Results of logistic regression analysis showed that GG genotype ($OR=9.485$, 95% CI: 2.169 ~ 44.283, $P=0.006$) and allelic gene G ($OR=5.105$, 95% CI: 1.847 ~ 13.360, $P=0.014$) were independent risk factors for colorectal cancer. **Conclusion** Polymorphism of Serpin B1 gene at H67Q site is related to gastric cancer.

[**Key words**] gastric cancer; serine protease inhibitor, clade B, member 1 gene; gene polymorphism; peripheral blood

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372580), the Supporting Project of Science and Technology Research of Hebei Province (11276103D-26), and the Key Project of Medical Sciences of Hebei Province (20160168). Corresponding author: Li Yong, Tel: 86-311-86095678, E-mail: li_yong_hbth@126.com

胃癌是严重威胁人类健康的消化系统恶性肿瘤。虽然近年来胃癌的发病率有所下降,但病死率和复发率却无明显改善[1-2]。胃癌病因中遗传因素有较为重要的意义[3-4]。胃癌早期无特异性症状,难以引起患者的重视。待症状明显时多已处于中晚期,许多患者失去了手术根治的机会。因此,采用简便的方法,找到胃癌的易感基因,对胃癌的防治有重要的临床意义。丝氨酸蛋白酶抑制剂 B1(serine protease inhibitor, clade B, member 1,Serpin B1)是蛋白酶抑制剂家族成员之一,能通过与多种蛋白酶活性部位不可逆结合,阻止酶原活化、表达、分泌、降解等作用以减少蛋白酶的生成或调节蛋白酶的水解活性,使蛋白酶水解减少,活性减弱,从而维持体内稳定[5-6]。当其发生活性或功能变化时,可能造成肿瘤的发生。有研究表明,Serpin B1 对肝癌细胞有调控作用[7],我们前期研究也发现 Serpin B1 基因与胃癌分化有关[8],但目前关于外周血 Serpin B1 基因多态性与胃癌之间关系尚不清楚。本研究检测了胃癌患者和健康人群外周血中 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性的分布差别以及不同基因型中 Serpin B1 浓度水平的变化情况,探讨 Serpin B1 与胃癌的发生、发展之间的联系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 1 月至 2015 年 12 月河北医科大学第四医院就诊并确诊为胃癌的 350 例患者作为病例组,均有病理学确诊。患者纳入标准:①有病理学证据确诊为胃癌;②患者均为初诊患者;③入组者未经过放疗、化疗、生物治疗等措施。排除标准:①合并其他恶性肿瘤患者;②复发或手术后患者;③合并严重肝肾、血液系统、免疫系统疾病患者;④经过术前治疗的患者;⑤妊娠期患者;⑥不能配合或不愿配合的患者。其中男性 201 例,女性 149 例,年龄(51.7 ± 10.8)岁。选取同期来我院查体的健康人 350 例为对照组。其中男性 203 例,女性 147 例,年龄(51.3 ± 13.3)岁。两组性别、年龄匹配,具有可比性。本研究由医院伦理委员会批准,研究对象均签署知情同意书。

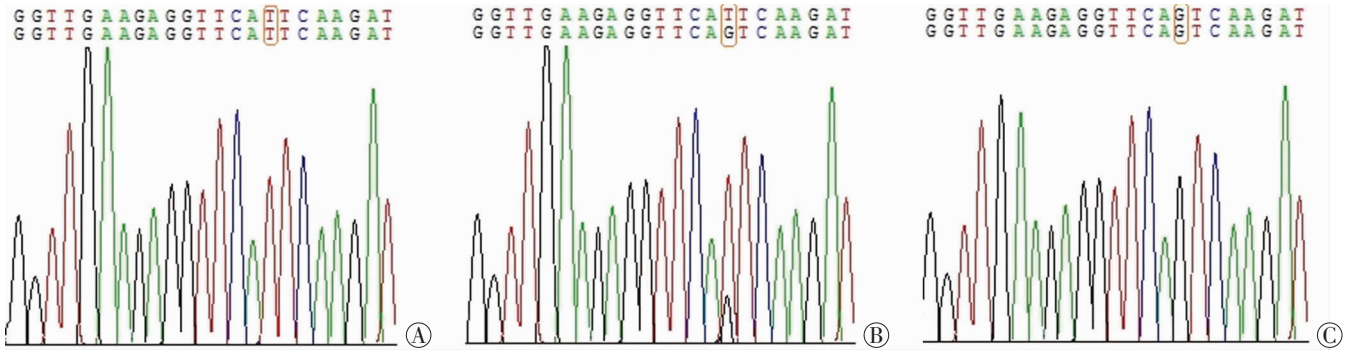
1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有入选者晨起空腹抽取静脉血 6 mL,4 mL 放入促凝管中,室温静置 30 min,3 500 r/min 离心(1 760 × g)15 min,分离血清,-20 ℃冻存备用;2 mL 放入 EDTA-K2 抗凝管中,充分混匀,-80 ℃ 冻存备用。

1.2.2 血清 Serpin B1 浓度的检测 选用人 SERPINB1 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司,货号:20151113)。使用前室温平衡 30 min,严格按照说明书操作。准确性:R ≥ 0.990 0,灵敏度:最低检测浓度 < 0.5 ng/mL,板内、板间变异系数均 < 15%,用酶免之星全自动酶标仪在 450 nm 处测定光密度值[D(450)],检测读数,计算样品浓度。

1.2.3 基因组 DNA 的提取 EDTA-K2 抗凝血应用 TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型,DP304),严格按照试剂盒说明书的规定操作,提取基因组 DNA。

1.2.4 扩增目的基因 Serpin B1 基因 H67Q 位点引物序列:上游为 5′-ACTTTATAGTTTCAAAATAA-3′,下游 5′-TTTTAGAATGTGAAGGGCAA-3′。建立由上下游引物、dNTP、模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、$MgCl_2$、10 × 扩增缓冲液组成的总体积为 50 μL 的 PCR 反应体系,先后经过预变性、变性、退火、延伸等实验过程条



A:TT 基因型;B:GT 基因型;C:GG 基因型

图 1 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性基因序列

表 1 病例组和对照组 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性基因型和等位基因频率分布比较[例数(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		TT	GT	GG	T	G
病例组	350	210(62.0)	92(26.3)[a]	48(13.7)[a]	512(73.1)	188(26.9)[a]
对照组	350	319(91.1)	20(5.7)	11(3.1)	658(94.0)	42(6.0)

a:$P<0.01$,与对照组比较

件下进行 PCR 扩增,扩增完成,取反应后体系中 5 μL PCR 扩增产物,经 2% 琼脂糖电泳检测确认并与标准(TaKaRa,150 bp)进行比较,判断 PCR 扩增产物的准确性。

1.2.5 DNA 序列分析 将扩增的 PCR 产物纯化,应用超高通量基因组测序系统 GS FLX + 系统(Roche Applied Science,型号 GS FLX + System)双向测序,得出 PCR 产物的基因组序列图。应用 DNAMAN 软件将测定结果与 GenBank 查询确定的基因序列进行比对,比较两者基因序列的差异。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;应用 Logistic 回归分析 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性与胃癌之间的关系。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 Serpin B1 基因 H67Q 位点直接测序结果

PCR 产物纯化后双向测序结果显示,Serpin B1 基因 H67Q 位点存在 2 种等位基因 G 和 T,共有 3 种基因型:纯合突变型(GG)、杂合突变型(GT)、野生型(TT)。Serpin B1 基因 H67Q 位点发生突变,该突变位于第 2 外显子,所在区域编码 Serpin B1 蛋白的 RSL 环状结构区,第 201 位碱基由 T 突变为 G,使第 67 位氨基酸由 CAT 突变为 CAG,即异亮氨酸突变为苯丙氨酸。结果见图 1。

2.2 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性基因型和等位基因频率分布

病例组与对照组基因型分布比较,差异有统计学意义($\chi^2=91.95$,$P<0.01$);病例组 GG 基因型频率、GT 基因型频率,均显著高于对照组($\chi^2=37.41$,66.83,$P<0.01$)。病例组 G 等位基因频率显著高于对照组($\chi^2=110.90$,$P<0.01$,表 1)。

2.3 不同基因型间 Serpin B1 浓度水平的比较

病例组中 Serpin B1 的浓度明显高于对照组($t=145.7$,$P<0.01$)。病例组中,GG 基因型 Serpin B1 的浓度明显高于 GT 基因型和 TT 基因型($t=2.846$,$P<0.01$;$t=8.895$,$P<0.01$);GT 基因型 Serpin B1 的浓度明显高于 TT 基因型($t=7.341$,$P<0.01$)。对照组中,GG 基因型 Serpin B1 的浓度明显高于 GT 基因型和 TT 基因型($t=36.490$,$P<0.01$;$t=43.593$,$P<0.01$);GT 基因型 Serpin B1 的浓度明显高于 TT 基因型($t=9.630$,$P<0.01$,表 2)。

2.4 Logistic 回归分析 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性与胃癌间的关系

以是否患有胃癌(无 =0,胃癌 =1)为因变量,以年龄(<50 岁 =0,≥50 岁 =1)、性别(男 =0,女 =1)、Serpin B1 基因 H67Q 位点基因型(Tt =0,Gt =1,GG =2)、等位基因($t=0$,G =1)、Serpin B1 浓度为自变量,进行

分析。结果显示,GG 基因型、G 等位基因与胃癌关系密切,GG 基因型、G 等位基因是胃癌的独立危险因素(表3)。

表2 各组不同基因型 Serpin B1 浓度水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Serpin B1 浓度(ng/mL)
病例组	350	295.3 ± 34.6[a]
GG 基因型	48	333.5 ± 48.2[abc]
GT 基因型	92	312.4 ± 37.8[ab]
TT 基因型	210	279.1 ± 35.6[a]
对照组	350	22.7 ± 5.3
GG 基因型	11	67.3 ± 2.7[bc]
GT 基因型	20	28.5 ± 2.9[b]
TT 基因型	319	20.8 ± 3.5

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 TT 基因组比较;c:$P<0.01$,与 GT 基因组比较

3 讨论

当前胃癌为严重威胁人类生命健康的重要疾病。胃癌的发生与多种因素有关,遗传因素在其中为重要因素[9]。确定与胃癌发生、发展相关的基因意义重大。本课题组前期研究发现 Serpin B1 基因与胃癌有关[8],但具体情况尚不清楚。其他研究也发现 Serpin B1 基因与恶性肿瘤有关[7]。为了解 Serpin B1 蛋白及基因多态性在胃癌患者外周血的表达及意义,本研究检测了外周血中 Serpin B1 的水平以及 Serpin B1 基因 H67Q 位点的多态性。

Serpin B1 属于蛋白酶抑制因子家族,广泛存在动植物体内,其主要作用为调节丝氨酸蛋白酶的生物活性。其蛋白结构含有 9 个 α-螺旋和 3 个 β-折叠,并形成 RSL 环状结构区,用于与靶向酶识别并共价结合,从而改变靶向蛋白酶的活性和功能[10-11]。当 Serpin B1 出现结构异常或功能异常时,蛋白酶的水解反应将失去控制,可能引起疾病的发生。本研究结果显示,与对照组相比较,胃癌患者外周血中 Serpin B1 的水平升高,就证实了 Serpin B1 可能与胃癌的发生有关。

Serpin B1 蛋白由 379 个氨基酸残基组成,当 Serpin B1 基因发生突变时,Serpin B1 双螺旋结构的空间构象发生变化,Serpin B1 蛋白的功能受到影响[12]。本研究中 Serpin B1 基因 H67Q 位点位于第 2 外显子,所在区域编码 Serpin B1 蛋白的 RSL 环状结构区,第 201 位碱基由 T 突变为 G,使第 67 位氨基酸由 CAT 突变为 CAG,即异亮氨酸突变为苯丙氨酸。该突变可能导致该区域结构异常,无法与蛋白酶识别结合,从而无法发挥其抑制作用。我们检测发现该单核苷酸多态性位点有 G、T 2 种等位基因,TT、GT、GG 3 种基因型。

本研究发现病例组和对照组外周血均存在 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性。本研究表明,病例组中 GG、GT 2 种基因型所占的比例明显高于对照组中的 2 种基因型所占的比例;病例组中 G 等位基因的频率(26.9%)远高于对照组中 G 等位基因的频率(6.0%)。因此我们推测 Serpin B1 基因 H67Q 位点突变可能与胃癌的发生关系密切,但尚待更为深入的研究予以证实。

本研究进一步把入组者按 GG、GT、TT 基因型分成 3 组,比较病例组和对照组中不同基因型之间 Serpin B1 浓度的变化。结果发现病例组与对照组中 GG 基因型 Serpin B1 的浓度明显高于 GT 基因型和 TT 基因型者;GT 基因型 Serpin B1 的浓度明显高于 TT 基因型者。从而证明 Serpin B1 基因 H67Q 位点突变影响了外周血中 Serpin B1 蛋白的水平。结果提示 Serpin B1 基因 H67Q 位点发生突变干扰了该基因的正常转录及翻译功能,使蛋白的抑制功能丧失,无法精准地控制细胞内外不断发生的各种各样的水解反应,破坏了机体内部环境的稳定,导致肿瘤发生。

为了解 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性与胃癌发生的关系,本研究进行了 Logistic 回归分析。结果显示 GG 基因型、G 等位基因是胃癌发生的重要危险因素,说明 Serpin B1 基因 H67Q 位点突变与胃癌有关,检测外周血 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性可能对预测胃癌发生有益。

表3 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性与胃癌关系的 Logistic 回归分析结果

变量	*B*	*SE*	*Wald*	*P*	*OR*	95% *CI*
年龄	0.374	0.389	1.246	0.213	0.853	0.437~1.168
性别	0.268	0.317	2.067	0.325	0.629	0.418~1.023
Serpin B1 浓度	0.167	0.228	1.925	0.116	0.924	0.504~1.429
基因型	3.016	0.402	13.275	0.006	9.485	2.169~44.283
等位基因	0.698	0.163	2.371	0.014	5.105	1.847~13.360

总之,本研究发现胃癌患者外周血中存在 Serpin B1 基因 H67Q 突变,且该突变为胃癌发生的危险因素。因此,检测 Serpin B1 基因 H67Q 位点多态性,对早期发现、早期诊断胃癌有益;外周血 Serpin B1 蛋白的检测也可能作为新的胃癌标志物。但本研究为单中心研究,尚需扩大研究规模并对 Serpin B1 基因的突变进行深入分析。

参考文献:

[1] Li Y, Zhao Q, Fan L Q, *et al*. Zinc finger protein 139 expression in gastric cancer and its clinical significance[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(48): 18346 - 18353. DOI:10.3748/wjg.v20.i48.18346

[2] Zhang Z D, Li Y, Fan Q, *et al*. Annexin A2 is implicated in multi-drug-resistance in gastric cancer through p38MAPK and AKT pathway[J]. Neoplasma, 2014, 61(6): 627 - 637. DOI:10.4149/neo_2014_078

[3] Zhang M X, Liu K, Wang F G, *et al*. Association between CYP2E1 polymorphisms and risk of gastric cancer: An updated meta-analysis of 32 case-control studies[J]. Mol Clin Oncol, 2016, 4(6): 1031 - 1038. DOI:10.3892/mco.2016.824

[4] Nie X, Wang X, Lin Y, *et al*. SNP rs1059234 in CDKN1A Gene Correlates with Prognosis in Resected Gastric Adenocarcinoma[J]. Clin Lab, 2016, 62(3): 409 - 416.

[5] Farley K, Stolley J M, Zhao P, *et al*. A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation[J]. J Immunol, 2012, 189(9): 4574 - 4581. DOI:10.4049/jimmunol.1201167

[6] Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, *et al*. Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 302(10): G1163 - G1170. DOI:10.1152/ajpgi.00292.2011

[7] Cui X, Liu Y, Wan C, *et al*. Decreased expression of SERPINB1 correlates with tumor invasion and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. J Mol Histol, 2014, 45(1): 59 - 68. DOI:10.1007/s10735-013-9529-0

[8] Liu Y, Li Y, Tan B B, *et al*. Technique appraisement of comparative proteomics and screening of differentiation-related protein in gastric carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(123): 633 - 637. DOI:10.5754/hge12794

[9] Jia Z F, Wang L Z, Cao X Y, *et al*. CD24 genetic variants contribute to overall survival in patients with gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(7): 2373 - 2382. DOI:10.3748/wjg.v22.i7.2373

[10] Benarafa C, LeCuyer T E, Baumann M, *et al*. SerpinB1 protects the mature neutrophil reserve in the bone marrow[J]. J Leukoc Biol, 2011, 90(1): 21 - 29. DOI:10.1189/jlb.0810461

[11] Baumann M, Pham C T, Benarafa C. SerpinB1 is critical for neutrophil survival through cell-autonomous inhibition of cathepsin G[J]. Blood, 2013, 121(19): 3900 - 3907. DOI:10.1182/blood-2012-09-455022

[12] El Ouaamari A, Dirice E, Gedeon N, *et al*. SerpinB1 Promotes Pancreatic β Cell Proliferation[J]. Cell Metab, 2016, 23(1): 194 - 205. DOI:10.1016/j.cmet.2015.12.001

(**收稿**:2016-06-28;**修回**:2016-09-23)

(编辑 汪勤俭)